蝶蛹金小蜂热激蛋白家族基因表达与热保护功能

王　欢[1,2]，李　凯[3]，方　琦[2]，叶恭银[2,*]
（1. 上海农林职业技术学院，上海 201699；2. 浙江大学昆虫科学研究所，杭州 310058；
3. 东华大学生物科学与技术研究所，上海 201620）

摘要：作为分子伴侣，热激蛋白可起修复变性蛋白与阻止其他蛋白质聚集的作用。为进一步理解蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 热激蛋白家族的分子伴侣功能，本研究对来自该寄生蜂的热激蛋白 Pphsp90，Pphsp70，Pphsc70，Pphsp60，Pphsp40 和 Pphsp20 的基因在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 菌株中进行了过表达。结果表明：除 Pphsp40 外，其余 5 个基因均得到高效表达，且表达的重组热激蛋白在高温下(80℃)具可溶性与热稳定性。其中，Pphsp20 与 Pphsp90 在大肠杆菌中的表达显著提高了高温下(50℃，1 h)细胞的存活率。离体活性实验证实，利用纯化的融合蛋白 Pphsp20 可减少高温下荧光素酶的聚集现象。据此认为，Pphsp20 与 Pphsp90 均具有大肠杆菌细胞的热保护功能，但 Pphsp20 可以单独发挥作用，而 Pphsp90 可能需其他因子协同作用才有保护活性。
关键词：蝶蛹金小蜂；热激蛋白；基因表达；蛋白热稳定性；蛋白纯化
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2012)08-0903-08

Prokaryotic expression and thermo-protective function of heat shock proteins from *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae)

WANG Huan[1,2], LI Kai[3], FANG Qi[2], YE Gong-Yin[2,*] (1. Shanghai Vocational and Technical College of Agriculture and Forestry, Shanghai 201699, China; 2. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3. Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: Acting as molecular chaperones, heat shock proteins (Hsps) could help fixing denatured proteins and preventing aggregation of other proteins. In order to better understand the function of molecular chaperones of Hsp families in the parasitoid *Pteromalus puparum*, Pphsp90, Pphsp70, Pphsc70, Pphsp60, Pphsp40 and Pphsp20 genes from this parasitoid were over-expressed in *Escherichia coli*. The results showed that the five genes except *Pphsp*40 were highly expressed and these expressed recombinant Pphsps were soluble and stable under high temperature (80℃). *In vivo* experiments, Pphsp20 and Pphsp90 significantly increased the survival rate of *E. coli* cells under high temperature (50℃, 1 h). *In vitro* protection study verified that only purified recombinant Pphsp20 could reduce the aggregation of luciferase under high temperature. The results suggest that both Pphsp20 and Pphsp90 may be involved in thermo-protective role in *E. coli*, and Pphsp20 may work independently while Pphsp90 requires the cooperation with other cofactors.
Key words: *Pteromalus puparum*; heat shock proteins; gene expression; protein thermo-stability; protein purification

热激蛋白(heat shock proteins, Hsps)是普遍存在于原核和真核生物中的一类高度保守的蛋白。Feder 和 Hofmann(1999)根据序列相似性和蛋白分子量大小将 Hsps 分为 Hsp110，Hsp100，Hsp90，Hsp70，Hsp60，Hsp40，Hsp10 和 sHsp 8 个家族。尽管不同生物体同一 Hsp 家族之间有高度序列相似性，但不同 Hsps 家族之间其序列无明显的相似性，功能上也不尽相同。

充当分子伴侣是 Hsps 的最主要功能，主要包括阻止蛋白聚体，促进蛋白折叠成正确的构象，将

基金项目：国家自然科学基金杰出青年基金项目(31025021)；上海市教育发展基金会晨光计划项目(10CGB18)；上海市教委优秀青年教师科研专项基金(nlz10010)
作者简介：王欢，女，1982 年生，江西资溪人，博士，讲师，研究方向为昆虫分子生物学和害虫生物防治，E-mail：wangh@shafc.edu.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: chu@zju.edu.cn
收稿日期 Received: 2012-05-10；接受日期 Accepted: 2012-08-03

变性蛋白降解或再折叠(Parsell and Lindquist, 1993; Sorensen *et al.*, 2003)。体内实验表明，热激蛋白能够调节胁迫后蛋白的折叠，高水平的热激蛋白可以增强生物的耐热能力(Yahara *et al.*, 1986; Heads *et al.*, 1995; Sorensen and Loeschcke, 2007; Colinet *et al.*, 2010)。离体实验表明，热激蛋白在高温下被激活(Yonehara *et al.*, 1996; 陈忠等, 1999)，保留部分变性蛋白的折叠能力(Freeman and Morinoto, 1996)，这可能是热激蛋白在胁迫细胞体内的重要营救机制。

蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 是菜粉蝶 *Pieris rapae* 的重要寄生蜂。多个热激蛋白家族现已克隆，转录表达实验证实其应对高温胁迫(Wang *et al.*, 2008, 2012)具有类似的及时响应机制，但它们具体的保护功能仍未明确。本研究以蝶蛹金小蜂体内获得的来自 6 个家族的 Hsps(Pphsp90, Pphsp70, Pphsc70, Pphsp60, Pphsp40 和 Pphsp20)为研究对象，表达出重组蛋白，并研究了其对大肠杆菌 *Escherichia coli* 细胞的热保护、蛋白热稳定性与离体条件下对荧光素酶的热保护作用，以期初步揭示蝶蛹金小蜂热激蛋白的功能，为重要害虫天敌蝶蛹金小蜂的生物防治利用提供帮助。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂、菜粉蝶幼虫和蝶蛹金小蜂寄生的菜粉蝶蛹均采自杭州市郊区。蝶蛹金小蜂在人工气候室(温度 25±1℃，相对湿度 80%，光周期 14L:10D)内进行续代饲养。菜粉蝶幼虫和蝶蛹金小蜂成蜂分别饲以新鲜甘蓝叶和 20% 蜂蜜水(v/v)。

1.2 主要材料与试剂

大肠杆菌 TG1、BL21(DE3)菌株及质粒 pET28a、pET28a-EGFP(增强绿色荧光蛋白基因与 pET28a 构建的重组表达质粒)均为本实验室保存。

总 RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司，LA Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司，ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司，鼠抗 His 单抗购自南京金斯特生物科技公司，辣根过氧化物酶标记的二抗购自 BBI 公司，融合蛋白纯化所用试剂盒 Ni-NTA His · Bind Resins 购自 Novagen 公司，纯化蛋白的脱盐和浓缩所用超滤柱购自 Millipore 公司，蛋白质定量(Bradford 法)试剂盒购自普利莱基因技术有限公司。

1.3 重组表达质粒(pET28a-*Pphsps*)的构建

按照 Trizol 试剂的使用说明提取蝶蛹金小蜂总 RNA，用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和浓度。随后取 1 μg 总 RNA 采用 ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA 第一链。

根据已经克隆得到的蝶蛹金小蜂 *Pphsps* 基因序列，设计扩增各 *Pphsps* 基因 ORF 部分所用引物，正反引物分别引入限制性内切酶位点 *Bam*H Ⅰ和 *Not* Ⅰ或 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ(表 1)。引物委托上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 蝶蛹金小蜂 *Pphsps* 基因 ORF 扩增引物

Table 1 Primers used for amplifying ORF of *Pphsp* genes from *Pteromalus puparum*

基因 Genes	引物序列(5′→3′) Primer sequence	酶切位点 Restriction site
Pphsp90	F: AAGGATCCATGGAGACTGCAGGAGGA	*Bam*HⅠ
	R: AGCGGCCGCTTAATCGACTTCCTCCAT	*Not*Ⅰ
phsc70	F: AAGAATTCATGGCCAAGGCACCCGCA	*Eco*RⅠ
	R: AAGCGGCCGCTTAGTCGACCTCCTCGAT	*Not*Ⅰ
Pphsp70	F: AAGGATCCATGCCTGCCATTGGTATT	*Bam*HⅠ
	AGCGGCCGCTTAATCCACCTCCTCCAC	*Not*Ⅰ
Pphsp60	F: AGGGATCCATGTTCAGACTACCAACA	*Bam*HⅠ
	R: A GCGGCCGCTTACATCATACCGCCCAT	*Not*Ⅰ
Pphsp40	F: CGGGATCCATGGAAAAGACTATTAC	*Bam*HⅠ
	R: AGCGGCCGCTCAATTCGGCAGCGTATC	*Not*Ⅰ
Pphsp20	F: AAGGATCCATGGCGGACAGCGGCAT	*Bam*HⅠ
	R: AGCGGCCGCTTAGTGATGCGCGATGG	*Not*Ⅰ

下划线为酶切位点。The restriction site is underlined.

以所得的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。反应体系为 50 μL，包括 35.5 μL ddH_2O，5 μL 10 × buffer，5 μL 25 mmol/L $MgCl_2$，1 μL dNTPs (10 mmol/L)，20 μmol/L 上游引物和下游引物各 1 μL，0.5 μL LA Taq DNA 聚合酶和 1 μL 模板。扩增条件为 94℃ 3 min; 94℃ 30 s，退火 50 s，72℃ 4 min，35 轮循环; 72℃ 10 min，退火温度分别为 50℃，58℃，53℃，54℃，54℃和 54℃。PCR 产物回收纯化后进行测序。将测序无误的 PCR 产物用 *Bam*H Ⅰ和 *Not* Ⅰ或 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ进行双酶切，对酶切产物进行回收纯化，与用相同酶处理的 pET28a 质粒按照片段载体分子比 3:1(mol/mol)的比例，在 T_4 DNA 连接酶的作用下，于 16℃ 连接 16 ~ 18 h

后，转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞，接种含抗生素卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 平板中培养 10 h。挑选单菌落接种于含抗生素卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 液体培养基中，37℃、200 r/min 振荡培养过夜，抽提质粒进行 PCR 和酶切鉴定，将重组后的质粒命名为 pET28a-*Pphsps*。

1.4　重组质粒 pET28a-*Pphsps* 的诱导表达

重组表达质粒经酶切鉴定，确定 6 个 ORF 已分别正确插入到 pET28a 中后，将重组表达质粒分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)中，IPTG 诱导融合蛋白表达。表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析，以空质粒 pET28a 转化 BL21(DE3)的诱导表达产物作对照。

将阳性质粒转化表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)，接种含卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 固体平板培养过夜，挑取单菌落于 LB 液体培养基(含抗生素)，于 37℃、200 r/min 培养 6 h；然后，按 1∶100 (v/v)转接扩大培养至 OD_{600}为 0.4 ~ 0.6，加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，28℃继续诱导培养 4 ~ 5 h。

1.5　融合蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

取 1.5 mL 经 IPTG 诱导后的菌液，用 PBS 清洗数次；加入 50 μL PBS 和 50 μL 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液，振荡混匀，沸水浴 5 min 后，于 12 000 r/min离心 10 min 以去除不溶物；取 10 μL 上样，进行 SDS-PAGE 检测、转印及 Western blot 分析，以转化空质粒 pET28a 的 BL21 经 IPTG 诱导的菌液作对照。

1.6　Pphsps 融合表达蛋白可溶性、热稳定性与对 *E. coli* 可溶性蛋白热保护作用

收集 1.5 mL 诱导培养的细胞，加入 PBS 溶液，超声波破碎细胞，使细胞中的蛋白释放到 PBS 溶液中，离心去除细胞碎片，取上清处理后进行 SDS-PAGE 检测。

收集 IPTG 诱导表达后转化有 pET28a-*Pphsps* 和 pET28a 质粒(对照)的大肠杆菌 BL21(DE3)细胞，用 PBS 清洗数次，加入 PBS，振荡混匀细胞，超声波破碎细胞，离心去除细胞碎片；取上清于干净离心管中，采用蛋白质定量(Bradford 法)试剂盒测定各样品中总蛋白浓度，并将浓度均稀释为 2.5 mg/mL；将定量后的蛋白样品分成 8 份，分别置于室温下及 30℃，40℃，50℃，60℃，70℃和 80℃水浴中处理 15 min；15 000 r/min、4℃离心 15 min，去除变性蛋白；小心吸取上清于新的离心管中，加入等体积的 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸后取 10 μL 上样，进行 SDS-PAGE 分析。

1.7　高温下 Pphsps 融合表达蛋白对 *E. coli* 细胞存活率的影响

将处于指数生长期的转化有 pET28a-*Pphsps* 和 pET28a-*egfp*(对照)的大肠杆菌 BL21 (DE3)菌液分别于 28℃、IPTG (1 mmol/L)诱导表达 4 h，尔后，置于 50℃热处理 1 h；将热处理的菌液连续稀释后涂布于含有抗生素卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 平板上，37℃培养过夜。同时，以未高温处理的转化重组质粒的经 IPTG 诱导的大肠杆菌细胞为对照。细胞的存活率根据 37℃过夜培养的平板上单菌落形成单位(colony forming units，CFU)计算。细胞存活率为高温处理后形成的 CFUs 相对未热处理形成的 CFUs 的百分率。本实验重复 6 次。

1.8　Pphsp20 和 Pphsp90 融合蛋白的纯化及萤火虫荧光素酶的高温保护作用

按照 Ni-NTA His · Bind Resins 试剂盒说明书，在非变性条件下，纯化 PpHsp20 和 PpHsp90 融合蛋白，并用 MILLIPORE 公司的超虑柱对纯化后的融合蛋白进行脱盐与浓缩。

在反应液中(荧光素酶 800 μg/mL，ATP-$MgCl_2$ 0.5 mmol/L，Tris (pH 7.5) 25 mmol/L，EDTA 1 mmol/L，KCl 25 mmol/L)加入纯化后的 Pphsp20 或 Pphsp90 融合蛋白至终浓度为 100 μg/mL，置于多功能酶标仪(BIO-TEK)中 42℃温育 30 min，每 2.5 min 测定 1 次 320 nm 处的吸收值。此值反应了高温下荧光素酶的聚集程度。同时，以不加重组热激蛋白的反应液为对照。每样品重复 5 次。

1.9　数据统计与分析

处理与对照差异采用单因素方差分析，以 LSD 法进行事后检验，数据分析使用 SPSS13.0 统计软件。

2　结果与分析

2.1　引入酶切位点的蝶蛹金小蜂热激蛋白基因(*Pphsps*)ORF 序列的扩增

根据设计的引物成功扩增获得引入酶切位点的蝶蛹金小蜂热激蛋白基因(*Pphsps*)ORF 序列，且扩增片段长度与预测结果一致(图 1)。扩增目的片段回收纯化后，用于构建重组表达质粒。

2.2　pET28a-*Pphsps* 在 BL21(DE3)中表达的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

Pphsp90，*Pphsp70*，*Pphsc70*，*Pphsp60* 和

*Pphsp*20 基因推测编码蛋白分子量分别为82.2，71.3，70.9，60.6 和 21.7 kDa。预测 pET28a-*Pphsps* 表达特异性条带大小应为 *hsps* 基因编码蛋白分子量加上约 3 kDa 的 pET28a 表达载体上融合的 6 × His 和连接肽部分。SDS-PAGE 分析结果表明，与对照相比，转化 pET28a-*Pphsp*90，pET28a-*Pphsp*70，pET28a-*Pphsc*70，pET28a-*Pphsp*60 和 pET28a-*Pphsp*20 质粒的样品分别在约 86，74，74，64 和 25 kDa 处出现靶标特异性条带(图 2，箭头所示)。Western blot 印迹结果表明 SDS-PAGE 分析 pET28a-*Pphsp*90，pET28a-*Pphsp*70，pET28a-*Pphsc*70，pET28a-*Pphsp*60 和 pET28a-*Pphsp*20 表达产物中出现的特异性条带即为与 6 × His 融合表达的目的蛋白(图2)，说明 *Pphsp*90，*Pphsp*70，*Pphsc*70，*Pphsp*60 和 *Pphsp*20 5 个基因在大肠杆菌中表达成功。pET28a-*Pphsp*40 表达产物未出现阳性条带(图 2)，说明 *Pphsp*40 基因未能在大肠杆菌中表达成功。

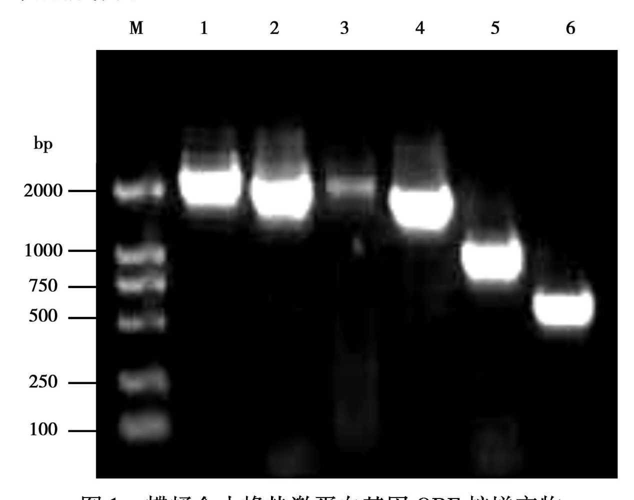


图 1 蝶蛹金小蜂热激蛋白基因 ORF 扩增产物

Fig. 1 Amplified product of ORF of *hsp* genes from *Pteromalus puparum*

M: DNA Marker DL2000; 1: *Pphsp*90; 2: *Pphsp*70; 3: *Pphsc*70; 4: *Pphsp*60; 5: *Pphsp*40; 6: *Pphsp*20.

2.3 融合表达蛋白的可溶性分析

在 pET28a-*Pphsp*90，pET28a-*Pphsp*70，pET28a-*Pphsc*70，pET28a-*Pphsp*60 和 pET28a-*Pphsp*20 诱导表达后的上清蛋白样品中，均含有较高浓度的融合表达蛋白(图 3，箭头所示)，说明 Pphsp90，Pphsp70，Pphsc70，Pphsp60 和 Pphsp20 融合表达蛋白基本上是以可溶的形式存在的。由于 *Pphsp*40 在大肠杆菌中未能成功表达，因此在 pET28a-*Pphsp*40 诱导后的上清中也未能检测到 PpHsp40 融合蛋白。

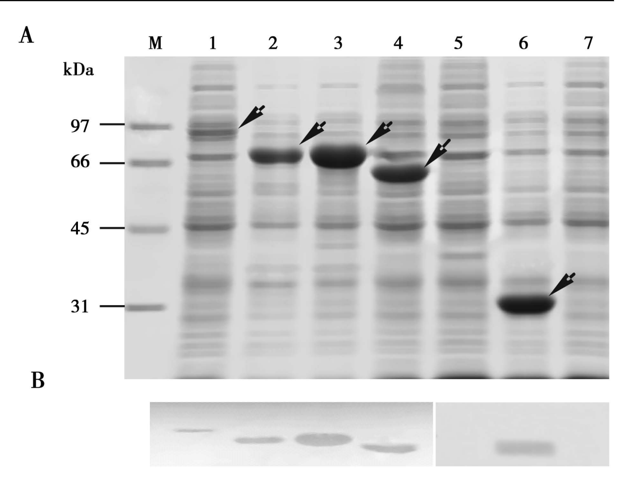


图 2 pET28a-*Pphsps* 表达的重组蛋白的 SDS-PAGE(A)与 Western blot(B)分析

Fig. 2 Analysis of recombinant proteins of pET28a-*Pphsps* by SDS-PAGE (A) and Western blot (B)

M: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight standard; 1: pET28a-*Pphsp*90 的表达产物 Expression product of pET28a-*Pphsp*90; 2: pET28a-*Pphsp*70 的表达产物 Expression product of pET28a-*Pphsp*70; 3: pET28a-*Pphsc*70 的表达产物 Expression product of pET28a-*Pphsc*70; 4: pET28a-*Pphsp*60 的表达产物 Expression product of pET28a-*Pphsp*60; 5: pET28a-*Pphsp*40 的表达产物 Expression product of pET28a-*Pphsp*40; 6: pET28a-*Pphsp*20 的表达产物 Expression product of pET28a-*Pphsp*20; 7: 空载体对照 pET28a control. 箭头指向重组蛋白。Arrows indicate the recombinant proteins.

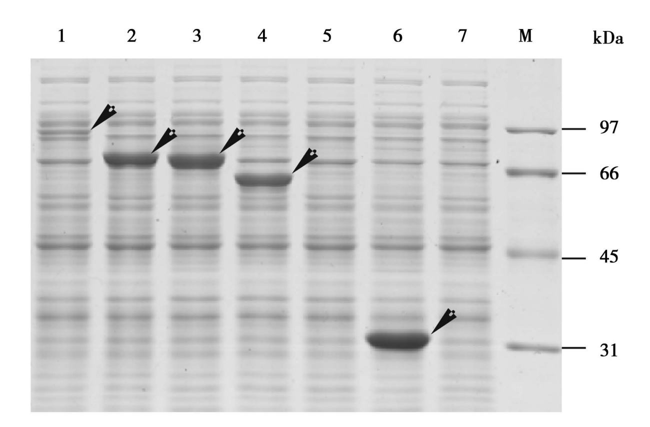


图 3 重组热激蛋白蛋白的可溶性鉴定

Fig. 3 Soluble identification of recombinant heat shock protein

M: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight standard; 1: pET28a-*Pphsp*90 的可溶性表达产物 Soluble expression product of pET28a-*Pphsp*90; 2: pET28a-*Pphsp*70 的可溶性表达产物 Soluble expression product of pET28a-*Pphsp*70; 3: pET28a-*Pphsc*70 的可溶性表达产物 Soluble expression product of pET28a-*Pphsc*70; 4: pET28a-*Pphsp*60 的可溶性表达产物 Soluble expression product of pET28a-*Pphsp*60; 5: pET28a-*Pphsp*40 的可溶性表达产物 Soluble expression product of pET28a-*Pphsp*40; 6: pET28a-*Pphsp*20 的可溶性表达产物 Soluble expression product of pET28a-*Pphsp*20; 7: 空载体对照 pET28a control. 箭头指向可溶性重组蛋白。Arrows indicate the soluble recombinant proteins.

2.4　Pphsps 融合表达蛋白热稳定性及其对 *E. coli* 细胞溶解产物热稳定性的研究

图 4 所示，当热处理温度高于 60℃时，转化 pET28a 质粒的菌液的可溶性蛋白(空载体对照)中已经基本看不到条带(图 4：F)，而含有重组 Pphsps 蛋白的粗提液中仍可见部分条带(图 4：A～E)，说明诱导表达的 Pphsps 蛋白能够抑制高温引起的 *E. coli* 内蛋白的变性。

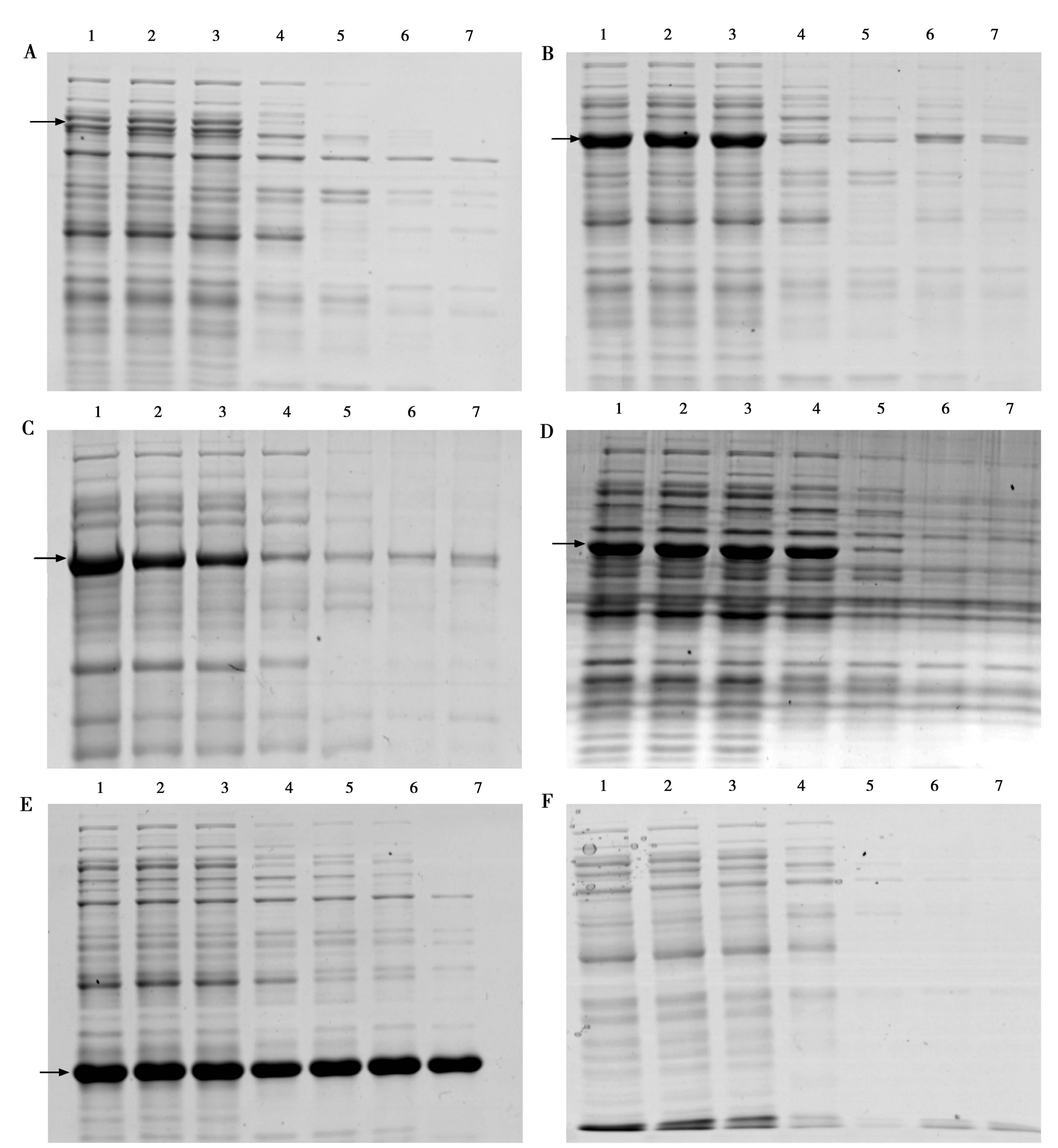


图 4　高温下 5 种重组热激蛋白的稳定性

Fig. 4　Thermo-stability of recombinant heat shock protein under high temperature

A：pET28a-*Pphsp*90 的可溶性表达产物 Soluble expression product of pET28a-*Pphsp*90；B：pET28a-*Pphsp*70 的可溶性表达产物 Soluble expression product of pET28a-*Pphsp*70；C：pET28a-*Pphsc*70 的可溶性表达产物 Soluble expression product of pET28a-*Pphsc*70；D：pET28a-*Pphsp*60 的可溶性表达产物 Soluble expression product of pET28a-*Pphsp*60；E：pET28a-*Pphsp*20 的可溶性表达产物 Soluble expression product of pET28a-*Pphsp*20；F：空载体对照 pET28a control；1：未经热处理的对照(室温)Control not subjected to heat treatment (room temperature)；2：30℃；3：40℃；4：50℃；5：60℃；6：70℃；7：80℃.

随着处理温度的逐渐升高，可溶性的 Pphsp60，Pphsp70，Pphsc70 与 Pphsp90 融合蛋白含量逐渐降低，而可溶性的 Pphsp20 融合蛋白在处理温度高达 80℃时，仍具有很高的含量(图 4)。这就意味着，相对其他热激蛋白，Pphsp20 蛋白具有更高的热稳定性。

2.5 高温下 Pphsps 融合表达蛋白对 *E. coli* 细胞存活率的影响

转化有 pET28a-*Pphsp*20 和 pET28a-*Pphsp*90 的 *E. coli* 细胞，经热处理后，其存活率显著高于转化 pET28a-*EGFP* 质粒(对照)的 *E. coli* 细胞，而转化 pET28a-*Pphsp*60，pET28a-*Pphsp*70 和 pET28a-*Pphsc*70 的 *E. coli* 细胞的存活率与对照相比无差异(图 5)。表明 Pphsp20 与 Pphsp90 重组蛋白的存在可提高高温下细胞存活率。

2.6 纯化的 Pphsp20 和 Pphsp90 融合蛋白对萤火虫荧光素酶的高温保护作用

将在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达的 Pphsp20 和 Pphsp90 融合蛋白采用 Ni-NTA 树脂分离纯化，纯化结果如图 6，经 2 次洗涤后，Pphsp20 和 Pphsp90 融合蛋白的纯化率达到 90% 以上。

图 7 所示，加入 Pphsp20 的荧光素酶样品中，高温引起的聚集现象可以被部分抑制，而不含任何热激蛋白的样品中，高温孵育后，荧光素酶会迅速聚集为不溶性颗粒；加入 Pphsp90 的荧光素酶样品中，荧光素酶光的散射程度与对照样品无差异。

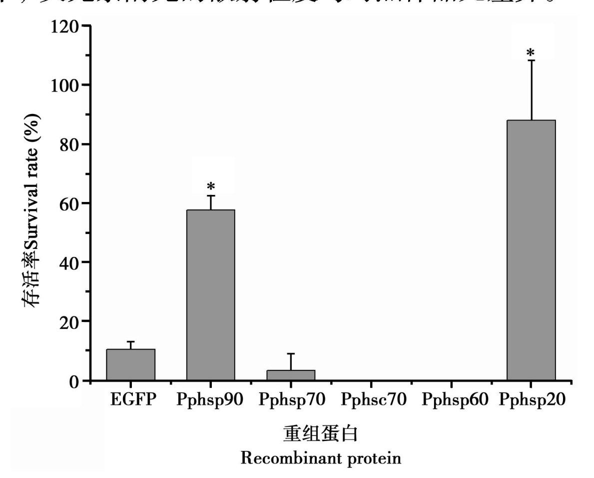
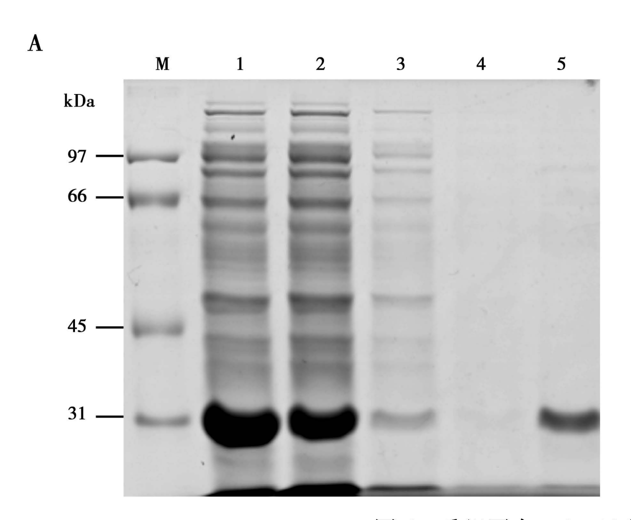


图 5 高温下重组热激蛋白蛋白对大肠杆菌细胞存活率的影响

Fig. 5 Effect of recombinant heat shock protein on survival rate of *Escherichia coli* cells under high temperature

图中重组热激蛋白的载体均为 pET28a；数据表示为平均值 ± 标准差(n = 6)，星号表示重组热激蛋白与对照重组荧光蛋白的差异显著($P < 0.05$，LSD 法检验)。All recombinant heat shock proteins were expressed in pET28a vector. All values in the figure represent mean ± *SD* (n = 6). Asterisks indicate significant difference between the recombinant heat shock protein and the EGFP control ($P < 0.05$, LSD test).



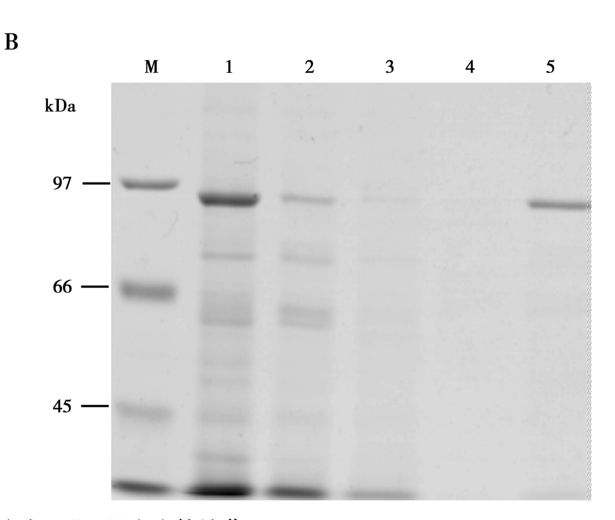


图 6 重组蛋白 Pphsp20(A)和 Pphsp90(B)的纯化

Fig. 6 Purification of recombinant Pphsp20 (A) and Pphsp90 (B)

M：蛋白分子量标准 Protein molecular weight standard；1：纯化前重组蛋白 Recombinant protein before purification；2：未吸附蛋白 Unabsorbed protein；3：第一次洗涤后的流出液 Effluent of the first washing step；4：第二次洗涤后的流出液 Effluent of the second washing step；5：纯化重组蛋白 Purified recombinant protein.

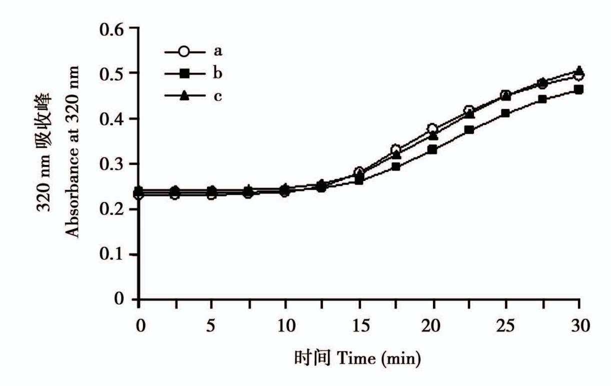


图 7　重组热激蛋白对荧光素酶高温下聚集的抑制

Fig. 7　Inhibition of luciferase aggregation under high temperature by recombinant heat shock protein

a: 仅无热激蛋白的阴性对照 (Negative control without additional Hsp); b: 重组 Pphsp20 (Recombinant Pphsp20); c: 重组 Pphsp90 (Recombinant Pphsp90).

3　讨论

热激蛋白的表达和调控，是生物有机体对多种内外环境胁迫条件产生应激反应达到自我保护的重要物质基础。本研究结果显示，蝶蛹金小蜂热激蛋白基因 *Pphsp*90，*Pphsp*70，*Pphsc*70，*Pphsp*60 和 *Pphsp*20 在大肠杆菌表达系统中表达成功，产生的融合蛋白主要以可溶的形式存在。研究发现表达的热激蛋白，在温度高达 80℃时仍然不变性。这一结果再次证明，热稳定性是热激蛋白基本特性之一，这可能与热激蛋白在极端温度下拯救细胞的功能有关(Yonehara *et al.*, 1996)。热激蛋白的热稳定性甚至可被利用于重组蛋白的纯化，以高温处理作为纯化第一步，去除大部分的杂蛋白(de Marco *et al.*, 2004)。

热激蛋白的存在与细胞耐热性获得具有明显相关性(Welte *et al.*, 1993)。高温下大肠杆菌可溶性蛋白易于变性，而重组热激蛋白对高温引起的大肠杆菌中可溶性蛋白变性均有明显的抑制作用(图 4)，说明 5 个热激蛋白均具有分子伴侣功能。然而，将过表达热激蛋白的大肠杆菌细胞置于 50℃处理，仅 Pphsp20 和 Pphsp90 表现出对大肠杆菌细胞有一定的保护作用，存活率显著高于对照(图 5)。这可能是由于不同分子伴侣的效应蛋白不同，如 Pphsp60，Pphsp70 和 Pphsc70 虽能抑制某些蛋白高温下聚集变性，但这些蛋白的活性可能与细胞的存活并不密切相关，而与 Pphsp20 和 Pphsp90 结合并被抑制构象发生变化的蛋白则对细胞存活至关重要。

有研究表明部分热激蛋白能够单独发挥其功能(陈忠等, 1999; Cho and Bae, 2007)。蝶蛹金小蜂纯化的重组 Pphsp20，在一定程度上可抑制高温引起的荧光素酶聚集，保持荧光素酶的可溶状态，表明 Pphsp20 在高温下可以直接稳定蛋白质的高级结构，也再次证明小分子热激蛋白能够阻止高温下蛋白质的聚集，同时还能帮助变性的荧光素酶复性(Ito *et al.*, 2001)。许多研究也表明，热激蛋白需要协同分子伴侣(co-chaperone)或其他物质的帮助才能充分发挥分子伴侣功能(Liberek *et al.*, 1991; Caplan *et al*, 1993; Ohtsuka *et al.*, 1993; Freeman and Morimoto, 1996; Yonehara *et al.*, 1996)。如蝶蛹金小蜂 Pphsp90 不能阻止高温引起的荧光素酶聚集，这说明离体条件下，Hsp90 不能独自发挥其功能，可能需要协同分子伴侣共同作用。有研究显示，通过添加其他分子伴侣，如 Pphsc70/hdj-1 复合物(Freeman and Morimoto, 1996)或网织红细胞裂解液(Yonehara *et al.*, 1996)，Hsp90 可以营救变性底物并将其成功地再折叠。这也是为什么 Hsp90 能对高温下大肠杆菌及其蛋白有一定的保护作用，主要可能是大肠杆菌中存在与蝶蛹金小蜂中 Pphsp90 的协同分子伴侣高度同源的蛋白，这些蛋白可以辅助 Pphsp90 发挥其功能。

本研究初步探讨了蝶蛹金小蜂热激蛋白的功能，但尚需将相关基因在真核生物如昆虫细胞中表达，以更好地测定其活性。此外，Hsp20 与 Hsp90 保护机制仍有待理清，如鉴定与 Hsp90 结合的辅助蛋白因子，从而更好地理解这类蛋白在蝶蛹金小蜂体内如何参与热保护作用。对蝶蛹金小蜂热激蛋白功能的深入了解，有助于阐明其抗高温及其他相关胁迫机理(Wang *et al.*, 2012)，能更进一步揭示该蜂应对极端温度的适应机理，为寄生蜂的生物防治策略奠定生理基础。

参考文献 (References)

Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG, 1993. Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* dnaj: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Mol. Biol. Cell*, 4(6): 555–563.

Cheng Z, Su WA, Tang ZC, 1999. Heat protective role and mechanism of heat shock protein Hpc60 from pea. *Chin. Sci. Bull.*, 44(22): 2171–2174. [陈忠, 苏维埃, 汤章城, 1999. 豌豆热激蛋白 Hpc60 对酶的高温保护功能及其机理. 科学通报, 44(22): 2171–2174]

Cho EK, Bae SJ, 2007. ATP-independent thermoprotective activity of *Nicotiana tabacum* heat shock protein 70 in *Escherichia coli*. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 40(1): 107–112.

Colinet H, Lee SF, Hoffmann A, 2010. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.*, 277(1): 174 – 185.

de Marco A, Casatta E, Savaresi S, Geerlof A, 2004. Recombinant proteins fused to thermostable partners can be purified by heat incubation. *J. Biotech.*, 107(2): 125 – 133.

Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 61: 243 – 282.

Freeman BC, Morimoto RI, 1996. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-I have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J.*, 15(12): 2969 – 2979.

Heads RJ, Yellon DM, Latchman DS, 1995. Differential cytoprotection against heat stress or hypoxia following expression of specific stress protein genes in myogenic cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 27(8): 1669 – 1678.

Ito H, Kamei K, Iwamoto I, Inaguma Y, Nohara D, Kato K, 2001. Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of αB-crystallin. *J. Biol. Chem.*, 276(7): 5346 – 5352.

Liberek K, Marszalek J, Ang D, 1991. The *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of Dnak. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(7): 2874 – 2878.

Ohtsuka K, Utsumi KR, Kaneda T, Hattori H, 1993. Effect of ATP on the release of hsp 70 and hsp 40 from the nucleus in heat-shocked Hela cells. *Exp. Cell Res.*, 209(2): 357 – 366.

Parsell DA, Lindquist S, 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 27: 437 – 496.

Sorensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.*, 6(11): 1025 – 1037.

Sorensen JG, Loeschcke V, 2007. Studying stress responses in the post-genomic era: its ecological and evolutionary role. *J. Biosci.*, 32(3): 447 – 456.

Wang H, Dong SZ, Li K, Hu C, Ye GY, 2008. A heat shock cognate 70 gene in the endoparasitoid, *Pteromalus puparum*, and its expression in relation to thermal stress. *BMB Rep.*, 41(5): 388 – 393.

Wang H, Li K, Zhu JY, Fang Q, Ye GY, 2012. Cloning and expression pattern of heat shock protein genes from the endoparasitoid wasp, *Pteromalus puparum* in response to environmental stresses. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 79(4 – 5): 247 – 263.

Welte MA, Tetrault JM, Dellavalle RP, Lindquist SL, 1993. A new method for manipulating transgenes: engineering heat tolerance in a complex multicellular organism. *Curr. Biol.*, 3(12): 842 – 853.

Yahara I, Iida H, Koyasu S, 1986. A heat shock-resistant variant of Chinese hamster cell line constitutively expressing heat shock protein of Mr 90,000 at high level. *Cell Struct. Funct.*, 11(1): 65 – 73.

Yonehara M, Minami Y, Kawata Y, Nagai J, Yahara I, 1996. Heat-induced chaperone activity of HSP90. *J. Biol. Chem.*, 271(5): 2641 – 2645.

(责任编辑: 赵利辉)